СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2023, том 58, № 2, с. 313-332

Генетика и геномика

УДК 636.52/.58:591.1:579.2:577.2 doi: 10.15389/agrobiology.2023.2.313rus

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИММУНИТЕТА И АДАПТАЦИИ И СОСТАВ МИКРОБИОМА У РОДИТЕЛЬСКОГО ПОГОЛОВЬЯ КУР И ПЕТУХОВ (*Gallus gallus* L.) ЛИНИЙ СМ5 И СМ9 КРОССА СМЕНА 9*

Г.Ю. ЛАПТЕВ[1], Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ[1, 2] ✉, Л.А. ИЛЬИНА[1, 2], В.А. ФИЛИППОВА[1, 2], К.А. КАЛИТКИНА[1], Е.С. ПОНОМАРЕВА[1], А.В. ДУБРОВИН[1], Д.Г. ТЮРИНА[1], В.И. ФИСИНИН[3], И.А. ЕГОРОВ[3], Т.А. ЕГОРОВА[3], В.А. МАНУКЯН[3], Т.Н. ЛЕНКОВА[3]

Породы корниш и плимутрок составляют основу современных специализированных мясных кроссов кур. Селекция отцовской линия породы корниш СМ5 нового российского кросса мясных кур Смена 9 ведется в основном по признакам мясной продуктивности, тогда как материнская линия породы плимутрок СМ9 — прежде всего на эффективность репродукции и жизнеспособность при более низкой, чем у линии СМ5, скорости роста живой массы. В настоящем исследовании мы впервые выявили у кур и петухов родительского поголовья линий СМ5 и СМ9 нового кросса Смена 9 различия, связанные с генотипом и полом, в экспрессии некоторых генов иммунитета и генов, связанных с адаптационным потенциалом, а также в составе и прогнозируемом функциональном потенциале микробиома. Целью работы было сравнение уровня экспрессии генов иммунитета и генов, связанных с адаптационным потенциалом, соответственно в тканях бурсы в печени, а также состава и функций микробиома слепых отростков кишечника у кур и петухов линий СМ5 и СМ9. Эксперименты проводили в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ» (Московская обл., 2022 год) на родительском поголовье кур и петухов линий СМ5 и СМ9 39-недельного возраста, содержавшихся в идентичных условиях и получавших одинаковый рацион. От каждой линии и пола отбирали образцы тканей у 5 особей с близкой живой массой. Анализ экспрессии генов в образцах тканей проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Тотальную РНК выделяли с помощью мини-набора Aurum™ Total RNA («Bio-Rad», США). ПЦР-амплификацию проводили с использованием SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix («Bio-Rad», США) и детектирующего амплификатора ДТлайт (НПО «ДНК-Технология», Россия). В тканях печени проводили анализ экспрессии генов, связанных с адаптационным потенциалом: гены *CAT1* транспортера катионных аминокислот 1, *HSF1* и *HSF2* — факторов транскрипции белков теплового шока 1 и 2, *SOD* — супероксиддисмутазы, *Gpx1* — глутатионпероксидазы, *HO-1* — гемоксигеназы-1. В тканях бурсы анализировали экспрессию генов, связанных с иммунитетом: гены *IL8* — интерлейкина-8, *IRF7* — регуляторного фактора интерферона 7, *PTGS2* — простагландин-эндопероксидсинтазы, *AvBD1*, *AvBD2*, *AvBD9* и *AvBD10* — β-дефензины 1, 2, 9 и 10, *Casp6* — каспазы 6. В качестве референсного контроля использовали праймер для гена β-актина (*ACTB*). Относительный уровень экспрессии оценивали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$. Тотальную ДНК для анализа состава микробиома выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Бактериальное сообщество слепой кишки оценивали методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с праймерами для V3-V4 региона гена 16S рРНК. Реконструкцию и прогнозирование функционального содержания метагенома, семейств генов, ферментов осуществляли при помощи программного комплекса PICRUSt2 (v. 2.3.0). Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли методом многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программах Microsoft Excel XP/2003 и R-Studio (v. 1.1.453). Полученные результаты показали увеличение экспрессии генов *HSF1* и *HSF2* у петухов линии СМ5 по сравнению с остальными группами ($p \leq 0,05$), в часности, разница с петухами линии СМ9 составляла соответственно 68 и 218 % ($p \leq 0,05$). Экспрессия генов *HSF1* и *HSF2* внутри линии СМ5 у петухов была выше соответственно в 1,6 и 3,0 раза, чем у кур ($p \leq 0,05$). Наблюдалась существенная активация экспрессии генов антимикробных пептидов и провоспалительных генов у петухов линии СМ9 по сравнению с петухами и курами линии СМ5 ($p \leq 0,05$). Так, экспрессия генов *AvBD2*, *AvBD9*, *AvBD10*, *IL8* и *PTGS2* у петухов линии СМ9 по сравнению с петухами линии СМ5 усиливалась соответственно в 7,6; 5,3; 2,1; 6,3 и 1,5 раза ($p \leq 0,05$). NGS-секвенирование показало, что в микробиоме слепых отростков кишечника у кур и петухов линии СМ9 присутствовали бактерии суперфилума *Elusimicrobiota* (соответственно 0,32±0,11 и 0,49±0,19 %), при этом у петухов линии СМ5 эти микроорганизмы не были выявлены, а у кур линии СМ5 их доля составляла 0,04±0,01 %. Между группами были обнаружены достоверные ($p \leq 0,05$) различия по 25 родам, у части родов — в зависимости от генотипа, у части — от пола птицы. Например, у

* Исследование выполнено по гранту Российского научного фонда №22-66-00061 «Экспрессия генов продуктивности и резистентности кур нового отечественного кросса «Смена 9» и ее влияние на иммунитет, особенности реализации генетического потенциала продуктивности при разном энерго-аминокислотном питании».

петухов линии СМ5 обилие микроорганизмов родов *Barnesiella*, Clostridia_UCG-014 и *Frisingicoccus* было соответственно в 17,2; 2,0 и 4,9 раза выше ($p \leq 0,05$), чем у петухов линии СМ9. Представители рода *Desulfovibrio* присутствовали в кишечнике петухов линий СМ5 и СМ9 (0,25±0,08 и 0,73±5,6 %); при этом в кишечнике кур обеих линий этих микроорганизмов мы не обнаружили. По результатам биоинформатической реконструкции и функциональной аннотации данных NGS-секвенирования в микробном сообществе кишечника выявлены 357 прогнозируемых метаболических путей, по 65 из которых наблюдались различия ($p \leq 0,05$) между группами. Специфические для генотипа и пола модуляции в экспрессии генов, а также в структуре и функциях кишечного микробиома могут обеспечивать адаптацию макроорганизма в изменяющихся условиях.

Ключевые слова: бройлерный кросс, Смена 9, слепые отростки кишечника, микробиом, NGS-секвенирование, прогнозируемые метаболические пути, экспрессия генов, иммунитет, адаптации, бурса, печень.

Результаты испытаний (1) показали, что птица нового отечественного кросса Смена 9 может успешно использоваться в бройлерном производстве. Породы корниш и плимутрок составляют основу современных специализированных мясных кроссов кур (2). На сегодняшний день о характеристике линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9 известно немного, имеются лишь данные, касающиеся в основном зоотехнических показателей. Главные селекционные признаки отцовской линии корниш СМ5 — живая масса, обмускуленность груди и ног (3). Однако в результате значительного увеличения живой массы и изменения экстерьера птицы породы корниш у нее наблюдается снижение оплодотворенности яиц и вывода цыплят. Низкая оплодотворяемость инкубационных яиц от кур селекционного прародительского и родительского стад служит главной причиной уменьшения выхода бройлеров от каждой родительской пары. Напротив, основные селекционные признаки материнской линии плимутрок СМ9 по сравнению с отцовской линией корниш СМ5 — это превосходство по яйценоскости, массе яиц, выходу цыплят, срокам наступления половой зрелости, жизнеспособности при меньшей скорости прироста живой массы молодняка и худшей конверсии корма (4). Напомним, что первоначально порода плимутрок создавалась для двойного использования (мясное и яичное направления продуктивности) (5).

Тем не менее известно, что разные фенотипы кур определяются сложными признаками, которые контролируются множеством генов. Исследования экспрессии генов сельскохозяйственной птицы показали, что некоторые зоотехнические параметры, в том числе продуктивность, могут быть связаны с различными клеточными механизмами, включая митохондриальный окислительный стресс, воспалительную реакцию, деградацию протеина, стрессовые реакции, передачу сигналов гормона роста, клеточный цикл и апоптоз, транспорт жирных кислот (6). Бурса представляет собой центральный и уникальный орган гуморального иммунитета у птиц, в котором происходит экспрессия множества генов, прежде всего связанных с иммунитетом (7), а также органом-мишенью для ряда патогенных микроорганизмов. Ткани печени играют центральную роль в адаптивном ответе на стрессы (8), которым птица часто подвержена в условиях интенсивного птицеводства. Доказано, что в печени экспрессируется множество генов, которые помогают организму бороться с изменениями условий окружающей среды — например, температуры, содержания кислорода в воздухе (9).

Поиск генов-кандидатов при селекции кур часто фокусируется на отборе по скорости роста (10) и экстерьеру (11), в то время как устойчивости к заболеваниям и стрессам уделяется гораздо меньше внимания. Благодаря функциям иммунной и пищеварительной систем (в частности, благодаря происходящей в бурсе и печени экспрессии генов, связанных с иммунитетом и формированием адаптационного потенциала) осуществляется

взаимодействие генотипа птицы со средой, что обеспечивает устойчивость к заболеваниям, изменениям условий кормление и др. В конечном итоге это влияет на показатели продуктивности и воспроизводства. В ряде работ определяли функциональную активность генов в органах и тканях бройлеров различных генотипов (6), но экспрессию связанных с иммунитетом и адаптациями генов в тканях бурсы и печени у линий нового кросса Смена 9 ранее не изучали.

Существуют также указания на то, что генетический фон хозяина может оказывать влияние и на вариабельность некоторых видов в составе кишечного микробиома (12). Микробиом кишечника кур включает огромное таксономическое разнообразие видов, а также функциональный потенциал их геномов и, как известно, оказывает существенное влияние на здоровье и продуктивность животных и птиц (13, 14). Известны также работы, демонстрирующие разницу в составе микробиома и его прогнозируемых функциях у животных в зависимости от пола (15). Тем не менее анализ изменений прогнозируемого функционального потенциала микробиома животных и птиц в зависимости от генотипа с применением биоинформатических программных комплексов, таких как PICRUSt2 и ему подобных, ранее не проводился.

В предыдущих исследованиях мы изучили экспрессию генов в тканях поджелудочной железы и эпителия кишечника у бройлеров кросса Смена 8 при экспериментальном Т-2 токсикозе (16), с помощью T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) проаналищировали состав микробиоты кишечника у двух линий мясных кур — Б5 (порода корниш) и Б9 (порода плимутрок) (17). Методами NGS-секвенирования и биоинформатики нами был исследован состав микробиома и его прогнозируемый метаболический потенциал у бройлеров кросса Смена 8 при воздействии Т-2 токсина и использовании кормовых добавок (18). У кур разных линий нового кросса Смена 9 состав и прогнозируемые функции микробиоты кишечника и экспрессия генов ранее не изучались.

Как и у млекопитающих, у птиц для самцов характерна более высокая скорость роста, чем для самок. Отчасти половые различия в скорости роста могут быть связаны с различиями между полами в микробиоме пищеварительной системы, поскольку его состав оказывает значительное влияние на переваривание, всасывание и метаболизм питательных веществ в организме хозяина, а также тесно связан с его иммунной системой и состоянием здоровья. Ряд исследователей наблюдали у животных выраженное проявление полового диморфизма в составе микробиомов (19), а также в характере экспрессии генов (20), что предполагает проведение подобных исследований на птице.

Поиск связи между генетическим фоном хозяина, составом его микробиома и уровнем экспрессии генов может помочь раскрыть новые биологические механизмы, связанные с высокой продуктивностью и воспроизводительной функцией, а также способствовать разработке более эффективных и, следовательно, устойчивых систем птицеводства (21).

В настоящем исследовании мы впервые выявили у кур и петухов родительского поголовья линий СМ5 и СМ9 нового кросса Смена 9 различия, связанные с генотипом и полом, в экспрессии некоторых генов иммунитета и генов, связанных с адаптационным потенциалом, а также в составе и прогнозируемом функциональном потенциале микробиома.

Цель нашего исследования заключалась в оценке различий в уровнях экспрессии набора генов иммунитета в бурсе и генов, связанных с адаптационным потенциалом, в печени, а также состава и функций микробиома

в слепых отростках кишечника у кур и петухов родительского стада разных линий кросса Смена 9 — отцовской линии СМ5 породы корниш и материнской линии СМ9 породы плимутрок, имеющих генетические различия по скорости роста, эффективности использования корма и репродуктивной функции.

Методика. Эксперименты проводили в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ» (Московская обл., 2022 год) на двух линиях родительского поголовья кур (*Gallus gallus* L.) отечественного кросса Смена 9 селекции СГЦ «Смена» (Московская обл.): на отцовской линии СМ5 породы корниш и материнской линии СМ9 породы плимутрок. Условия экспериментов соответствовали требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986) (22). Режимы кормления и содержания соответствовали требованиям для кросса (23) и были идентичными для всей экспериментальной птицы. В возрасте 30 нед из птицы сформировали 4 группы по 5 гол. в каждой с близкой живой массой: I группа — куры отцовской линии СМ5 породы корниш, II — петухи отцовской линии СМ5 породы корниш, III — куры материнской линии СМ9 породы плимутрок, IV — петухи материнской линии СМ9 породы плимутрок. Птицу декапитировали в возрасте 39 нед и проводили вскрытие.

После декапитации для анализа экспрессии генов отбирали ткани бурсы и печени. Образцы немедленно стабилизировали с помощью реагента RNAlater («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) и незамедлительно отправляли в лабораторию (ООО «БИОТРОФ+») для выделения РНК.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR, quantitative reverse transcription PCR). Образцы тканей гомогенизировали после добавления жидкого азота. Тотальную РНК выделяли с использованием мини-набора Aurum™ Total RNA («Bio-Rad», США), следуя инструкциям производителя. Реакцию обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК проводили с помощью набора iScript™ Reverse Transcription Supermix («Bio-Rad», США) (24).

Для анализа экспрессии мРНК в печени и бурсе были выбраны специфические праймеры (25). В качестве референсного контроля использовали праймеры для амплификации гена «домашнего хозяйства», кодирующего белок бета-актин ACTB: F — 5′-CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA-3′, R — 5′-ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3′. Амплификацию проводили с использованием SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix («Bio-Rad», США) в соответствии с протоколом производителя (26) (амплификатор детектирующий ДТлайт, НПО «ДНК-Технология», Россия). Режим и условия амплификации при анализе тканей печени и бурсы были следующими: 5 мин при 95 °C (предварительный денатурация); 30 с при 95 °C, 30 с при 60 °C, 30 с при 70 °C (40 циклов) (27). Оценка относительного уровня экспрессии проводилась с использованием метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ (28).

Для анализа состава микробиома в конце эксперимента вручную отбирали пробы химуса из слепых отростков кишечника у трех птиц из каждой группы с максимально возможным соблюдением условий асептики. Отобранные образцы немедленно помещали в центрифужные стерильные пластиковые пробирки. Все образцы замораживали при –20 °C и транспортировали в сухом льду в лабораторию (ООО «БИОТРОФ+») для выделения ДНК.

Тотальную ДНК для анализа состава кишечного микробиома выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Thermo

Fisher Scientific, Inc.», США) согласно прилагаемой инструкции методом, основанным на селективном детергентно-опосредованном осаждении ДНК из субстрата с применением растворов 1,2 М хлорида натрия и хлороформа для лизиса клеточных стенок и осаждения ДНК.

Структуру бактериального сообщества слепой кишки оценивали методом NGS-секвенирования (next generation sequencing) на платформе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с праймерами для V3-V4 региона гена 16S рРНК. Прямой праймер: 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3′; обратный праймер: 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3′. ПЦР проводили при следующих условиях: 3 мин при 95 °С; 30 с при 95 °С, 30 с при 55 °С, 30 с при 72 °С (необходимо для удлинения последовательности) (25 циклов); 5 мин при 72 °С (окончательная элонгация). Секвенирование осуществляли с реагентами для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit («Illumina, Inc.», США), для очистки ПЦР-продуктов — Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter, Inc.», США) и для проведения секвенирования — MiSeq® ReagentKit v.2 (500 cycle) («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2×250 п.н.

Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 v.2020.8 (https://docs.qiime2.org/2020.8/). После импорта последовательностей в формате .fastq из секвенирующего прибора и создания необходимых для работы файлов сопоставления, содержащих метаданные изучаемых файлов, парные строки прочтений были выровнены. Далее последовательности фильтровали по качеству с использованием параметров настроек по умолчанию. Фильтрацию шумовых последовательностей проводили с помощью встроенного в пакет QIIME2 метода DADA2, включающего информацию о качестве в свою модель ошибок, что делает алгоритм устойчивым к последовательностям более низкого качества, при этом использовали максимальную длину последовательности обрезки, равную 250 п.н. (https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html). Для построения филогении de novo выполнили множественное выравнивание последовательностей, применяя программный пакет MAFFT (https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/), далее проводили маскированное выравнивание последовательностей, чтобы удалить позиции, которые значительно различались. Для анализа таксономии использовали справочную базу данных Silva 138.1 (https://www.arb-silva.de/documentation/release-138.1/).

На основании полученной таблицы оперативно-таксономических единиц (ОТЕ, operational taxonomic unit, OTU) с использованием плагинов программного пакета QIIME2 были рассчитаны индексы биоразнообразия, а также построен график зависимости числа ОТЕ от числа прочтений. При статистическом анализе индексов разнообразия их дополнительного преобразования не проводили.

Реконструкцию и прогнозирование функционального содержания метагенома, семейств генов, ферментов осуществляли при помощи программного комплекса PICRUSt2 v.2.3.0 (https://github.com/picrust/picrust2). С программой работали согласно рекомендованному сценарию действий, все настройки использовали по умолчанию. ОТЕ каждого образца расположили в соответствии с его содержанием, от большего к меньшему, значения преобразовали с помощью логарифмического преобразования Log2. Для анализа метаболических путей и ферментов пользовались базой данных MetaCyc (https://metacyc.org/). Прогнозируемые профили метаболических путей MetaCyc оценивали по обилию ASV (Amplicon Sequence Variants). Данные и подсчет статистических показателей визуализировали с помощью веб-прило-

жения Phantasus v.1.11.0 (https://artyomov-lab.wustl.edu/phantasus/), в котором, помимо основных методов визуализации и фильтрации, поддерживаются методы на основе R, такие как кластеризация k-средних, анализ основных компонентов или анализ дифференциальных выражений с пакетом limma.

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли методом многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программах Microsoft Excel XP/2003, R-Studio v.1.1.453 (https://rstudio.com). Результаты представлены как средние (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Достоверность различий устанавливали по *t*-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$. Средние значения сравнивали с использованием теста достоверно значимой разницы Тьюки (HSD) и функции TukeyHSD в пакете R Stats Package.

Результаты. Праймеры, использованные при анализе экспрессии изученных генов, представлены в таблице 1.

1. Праймеры, использованные при изучении генной экспрессии у кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий СМ5 и СМ9 нового мясного кросса Смена 9 (виварий СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год)

Ген, его продукт	Последовательность праймеров (5′→3′)
Гены, связанные с адаптационным потенциалом (в печени)	
CAT1, транспортер катионных аминокислот 1	F: ACCAAGTACTGCAAGGCGAA, R: TGAGGGTTCCTCTTCTGGCT
HSF1, фактор транскрипции белков теплового шока 1	F: CAGGGAAGCAGTTGGTTCACTACACG, R: CCTTGGGTTTGGGTTGCTCAGTC
HSF2, фактор транскрипции белков теплового шока 2	F: CGCTGCTCGCATTCCT, R: TGTGGCCTCACTTGCTTCT
SOD, супероксиддисмутаза	F: CGGGCCAGTAAAGGTTACTGGAA, R: TGTTGTCTCCAAATTCATGCACATG
Gpx1, глутатионпероксидаза 1	F: GCATCCGCTTCCACGACTTCCT, R: CCGCTCATCCGGGTCCAACAT
HO-1, гемоксигеназа-1	F: GGTCCCGAATGAATGCCCTTG, R: ACCGTTCTCCTGGCTCTTGG
Гены, связанные с иммунитетом (в бурсе)	
IL8, интерлейкин-8	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGA, R: TAACATGAGGCACCGATGTG
IRF7, регуляторный фактор интерферона 7	F: ATCCCTTGGAAGCACAACGCC, R: CTGAGGCAACCGCGTAGACCTT
PTGS2, простагландин-эндопероксидсинтаза	F: TCGAGATCACACTTGATTGACA, R: TTTGTGCCTTGTGGGTCAG
AvBD1, β-дефензин 1	F: CCGTTTCTGTCACCGTCA, R: CCTTTGCTAAAAATCCCTTC
AvBD2, β-дефензин 2	F: GCACTCCAGGTTTCTCCA, R: GGCGTCCGACTTTGATTA
AvBD9 (*Gal9*), β-дефензин 9	F: AACACCGTCAGGCATCTTCACA, R: CGTCTTCTTGGCTGTAAGCTGGA
AvBD10 (*Gal10*), β-дефензин 10	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT, R: CCAGAGATGGTGAAGGTG
Casp6, каспаза 6	F: CAGAGGAGACAAGTGCCAGA, R: CCAGGAGCCGTTTACAGTTT

Результаты анализа экспрессии генов, связанных с адаптационным потенциалом, в тканях печени кур и петухов линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9 показаны на рисунке 1. Обращает на себя внимание увеличение экспрессии генов *HSF1* и *HSF2* у петухов отцовской линии СМ5 породы корниш (II группа) по сравнению с I, III и IV группами ($p \leq 0{,}05$). Разница по уровню экспрессии генов *HSF1* и *HSF2* с петухами материнской линии СМ9 породы плимутрок (IV группа) составляла соответственно 68 и 218 % ($p \leq 0{,}05$). Ген *HSF1*, важным паралогом которого является *HSF2*, функционирует как фактор транскрипции, индуцируемый стрессом, и играет центральную роль в активации реакции на тепловой шок, что приводит к экспрессии большого класса молекулярных шаперонов — белков теплового

шока (HSP), защищающих клетки от повреждения (29). Ранее коллективом ученых (30) была проанализирована экспрессия генов *HSF1*, *HSF3*, *HSP70* и *HSP90* у двух местных бразильских пород кур (Peloco и Caneluda) и коммерческой линии бройлеров Cobb 500 в ответ на тепловой стресс (39±1 °C). Было показано, что уровень экспрессии некоторых генов теплового шока (*HSP70* и *HSP90*) на фоне теплового стресса варьировался в значительной степени в зависимости от породы. У местных пород была детектирована повышенная экспрессия генов по сравнению с таковой у кросса Cobb 500, что имело связь с поведенческими реакциями и продуктивностью на фоне теплового стресса.

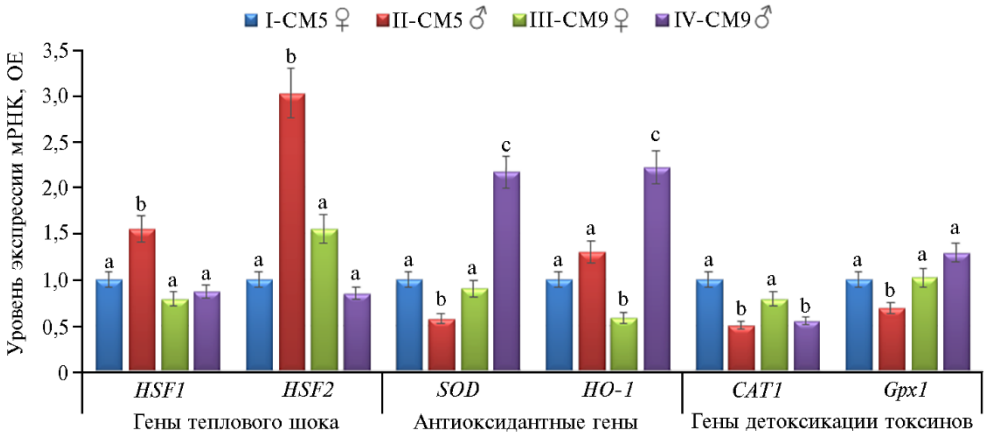

Рис. 1. **Уровень экспрессии генов, связанных с адаптационным потенциалом, в печени кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9** (виварий СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год). Все группы содержались в идентичных условиях и получали идентичный рацион (данные получены в возрасте 39 нед). ОЕ — кратность изменений уровня экспрессии по сравнению с I группой, где показатель принимали за 1; a-c — различия между показателями без общего буквенного обозначения статистически значимы при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее со стандартной ошибкой среднего (M±SEM) для экспрессии мРНК.

Как уже отмечалось, главными селекционными признаками отцовской линии корниш СМ5 служат живая масса, обмускуленность груди и ног (3). Известно, что в большинстве случаев фенотипические различия между индивидуумами вызваны генетическими изменениями, причем эти генетические различия тесно связаны с экспрессией и функцией генов (31). Как и у других видов, у кур масса тела — полигенный признак, на нее могут оказывать влияние варианты во многих локусах. Кроме того, у птицы, особенно у бройлеров, живая масса — объект прямого отбора (32). Сообщалось, что у мышей живая масса — количественный признак, обусловленный регуляторной вариацией в локусе *Glypican 3* (33), эффект которого проявляется посредством изменения в экспрессии генов в тканях печени. По аналогии генетические варианты, которые влияют на массу тела птиц, могут опосредованно воздействовать, например, на устойчивость к тепловому стрессу. Кроме того, печень, в тканях которой мы наблюдали изменение экспрессии генов *HSF1* и *HSF2*, представляет собой ключевой орган, участвующий в метаболизме углеводов, белков и жиров, она вырабатывает и расщепляет гормоны. Эти факты свидетельствуют о том, что изменение экспрессии генов *HSF1* и *HSF2* может иметь связь с разным уровнем продуктивности у изучаемых линий. Интересно, что указанные гены также играют роль в регуляции продолжительности жизни (34) и, соответственно,

могут представлять ценность в качестве маркера, связанного с продуктивным долголетием у сельскохозяйственной птицы.

Кроме того, наблюдалось увеличение экспрессии генов *SOD* и *HO-1* (см. рис. 1) у петухов материнской линии СМ9 породы плимутрок из IV группы по сравнению с I, II и III группами ($p \leq 0,05$). Разница по уровню экспрессии генов *SOD* и *HO-1* с петухами отцовской линии СМ5 породы корниш (II группа) составляла соответственно 160 и 92 % ($p \leq 0,05$). Гены *SOD* и *HO-1* относятся к группе генов антиоксидантных ферментов. Фермент супероксиддисмутаза (SOD) катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода и таким образом играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом (35). Основная функция HO-1 заключается в катаболизме гема с образованием биливердина, свободного железа и монооксида углерода. В условиях стресса активность гемоксигеназы-1 может возрастать более чем в 10 раз. Гемоксигеназа и продукты деградации гема проявляют выраженные цитопротективные свойства (36). Как было отмечено выше, основные селекционируемые признаки линии материнской формы СМ9 (плимутрок) в отличие от отцовской линии СМ5 (корниш) — яйценоскость, масса яиц, выход цыплят, сроки наступления половой зрелости, жизнеспособность (4). Предполагается, что среди различных питательных веществ в рационе матери, которые могут существенно повлиять на развитие эмбрионов и жизнеспособность цыплят в ранний период после вылупления, решающее значение имеют природные антиоксиданты. Накопление эндогенных антиоксидантов в яйце и эмбриональных тканях, очевидно, может служить основным адаптивным механизмом для защиты от окислительного стресса, испытываемого при вылуплении, причем SOD как ключевой элемент антиоксидантной сети играет здесь главную роль (37). По нашему мнению, этот адаптивный механизм может иметь связь с различным уровнем экспрессии антиоксидантных генов *SOD* и *HO-1*.

Стоит отметить, что в уровне экспрессии генов в печени птицы внутри изученных линий наблюдались различия между полами. Так, экспрессия генов *HSF1* и *HSF2* в линии СМ5 была выше у петухов соответственно в 1,6 и 3,0 раза по сравнению с курами ($p \leq 0,05$). В линии СМ9 у петухов экспрессия генов *SOD* и *HO-1* была выше ($p \leq 0,05$), чем у кур. Следовательно, в печени птицы профиль экспрессии генов, связанных с адаптационным потенциалом, варьируется в зависимости от пола. Учитывая роль печени в энергетическом балансе и разницу между самцами и самками в размерах тела и физиологии, полученные данные представляются закономерными. Ранее на примере мышей показан широкий половой диморфизм в экспрессии генов в печени (20). Было продемонстрировано (38), что около 72 % генов, функционально активных в печени мышей, сексуально диморфны по экспрессии.

Данные анализа экспрессии генов, связанных с иммунитетом, в бурсе кур и петухов разных линий кросса Смена 9 показаны на рисунке 2. Наблюдалась существенная активация экспрессии генов антимикробных пептидов и провоспалительных генов у петухов линии СМ9 (IV группа) по сравнению с петухами и курами линии СМ5 (I и II группы, $p \leq 0,05$). Так, по сравнению со II группой экспрессия генов *AvBD2*, *AvBD9*, *AvBD10*, *IL8* и *PTGS2* повышалась соответственно в 7,6; 5,3; 2,1; 6,3 и 1,5 раза ($p \leq 0,05$). Экспрессия генов *AvBD2* и *PTGS2* была повышена и у кур линии СМ9 по сравнению с курами линии СМ5 ($p \leq 0,05$). Эти данные перекликаются с представленными выше результатами увеличения экспрессии гена *HO-1* у

петухов линии CM9 по сравнению с петухами линии CM5.

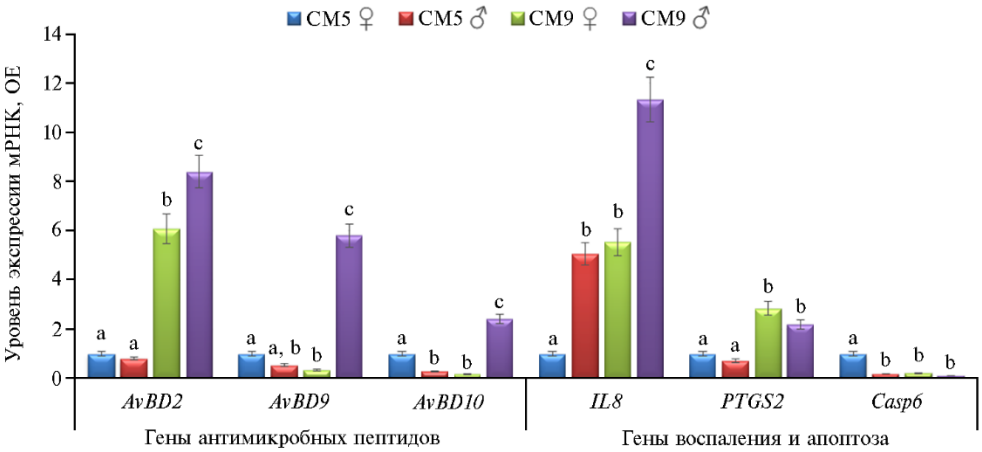

Рис. 2. Уровень экспрессии генов, связанных с иммунитетом, в бурсе кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий CM5 и CM9 кросса Смена 9 (виварий СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год). Все группы содержались в идентичных условиях и получали идентичный рацион (данные получены в возрасте 39 нед). OE — кратность изменений уровня экспрессии по сравнению с I группой, где показатель принимали за 1; a-c — различия между показателями без общего буквенного обозначения статистически значимы при $p \leq 0{,}05$. Результаты представлены как среднее со стандартной ошибкой среднего ($M \pm SEM$) для экспрессии мРНК.

Известно, что индукция клетками HO-1 способствует снижению интенсивности окислительных процессов, а также стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов (36). AvBD2, AvBD9 и AvBD10 — это дефензины, которые обладают антимикробной активностью в отношении различных патогенов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии, вирусы и грибы (39). У птиц идентифицировали 14 β-дефензинов — от AvBD1 до AvBD14 (40). Сообщалось (41) об антимикробной активности белков AvBD2, AvBD3, AvBD4, AvBD6, AvBD7, AvBD11 и AvBD13 протви *Escherichia coli*. Провоспалительные цитокины, например интерлейкины, играют важную роль в иммуномодуляции и воспалении (42). IL-8 — хемокин, который рекрутирует лейкоциты (43). Активация провоспалительных цитокинов тесно связана с экспрессией гена *PTGS2*, поскольку цитокины способны индуцировать транскрипцию этого гена (44). Ген *PTGS2* связан с синтезом эндопероксидсинтазы простагландинов (циклооксигеназы 2), которая катализирует окислительное превращение арахидоновой кислоты в простагландин. Простагландин впоследствии метаболизируется до различных биологически активных метаболитов — простациклина и тромбоксана A2, принимая участие как в местных, так и в системных воспалительных реакциях (45). Более высокий уровень экспрессии генов иммунитета в тканях бурсы у линии CM9 в отличие от линии CM5 может иметь связь с улучшенными репродуктивными качествами. Защита от инфекций и размножение — ключевые признаки на протяжении всей жизни индивидуума, следовательно, отбор должен обеспечивать оптимальную регуляцию обоих этих процессов (46). Последствия ущерба от заражения патогенами, вызванные иммунопатологиями, могут приводить к ухудшению репродуктивных качеств. То есть репродуктивное здоровье птицы зависит от иммунного ответа, способного предотвратить развитие заболевания, блокируя проникновение патогенов. Тем не менее C.H. Chao и Y.P. Lee (47), напротив, показали, что у цыплят тайваньской породы высокий уровень

γ-глобулина в плазме крови был генетически связан с низкой фертильностью.

Изменения в экспрессии генов хозяина, которые имеют прямую связь с его метаболизмом, могут влиять и на состав кишечного микробиома, и на прогнозируемый функциональный профиль микробных сообществ, при этом возможен и встречный эффект (влияние микробиоты на экспрессию) (48). Учитывая выявленные различия в экспрессии генов в печени и бурсе птицы, далее мы изучили состав и функцию микробиоты у кур и петухов линий СМ5 и СМ9.

В нашем исследовании при NGS-секвенировании микробиома слепых отростков кишечника у птицы линий СМ5 и СМ9 было сгенерировано в общей сложности 109690 секвенированных последовательностей гена 16S рРНК с медианой (*Me*) считываний 9601 (min = 4013; max = 13541) (рис. 3).

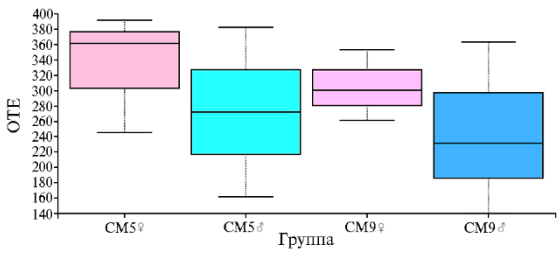

Рис. 3. Число оперативных таксономических единиц (OTE) **по результатам NGS-секвенирования микробиома кишечника кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9** (опыт в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год). Все группы содержались в идентичных условиях и получали идентичный рацион (данные получены в возрасте 39 нед).

При сравнении по индексам биоразнообразия Chao1, Shannon и Simpson (рис. 4) нам не удалось выявить достоверных различий между группами.

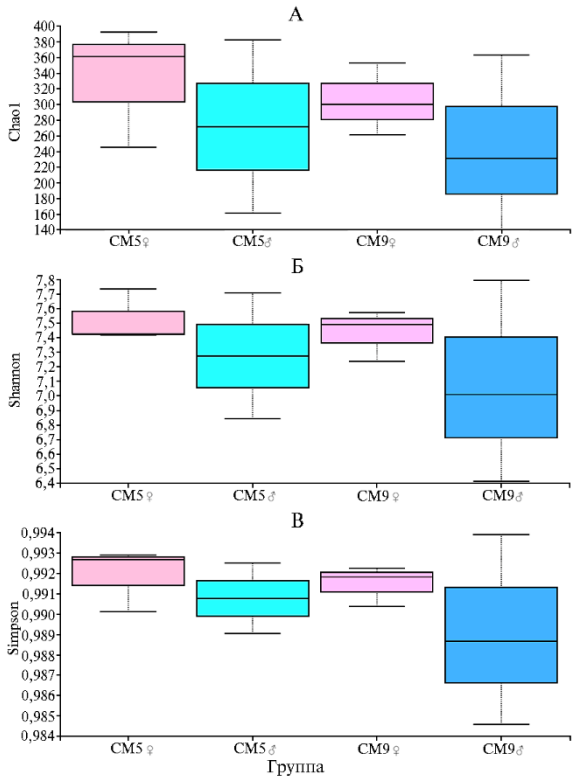

Рис. 4. **Абсолютные значения индексов биоразнообразия Chao1** (А)**, Shannon** (Б)**, Simpson** (В) **для микробиома кишечника кур и петухов (*Gallus gallus* L.) кросса линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9** (опыт в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год). Рассчитано с использованием плагинов программного пакета QIIME2 v.2020.8 (https://docs.qiime2.org/2020.8/).

В составе микробиома кишечника у птицы из всех групп присутствовали 15 бактериальных филумов и суперфилумов (рис. 5).

Среди них доминировали *Bacteroidota*, *Bacillota* и *Verrucomicrobiota*, при этом самым многочисленным оказался филум *Bacillota* (от 48,7±8,5 до 54,0±13,0 %). О доминировании бактерий филума *Bacillota* в составе кишечного микробиома сельскохозяйственной птицы сообщали ранее и другие исследователи (49, 50).

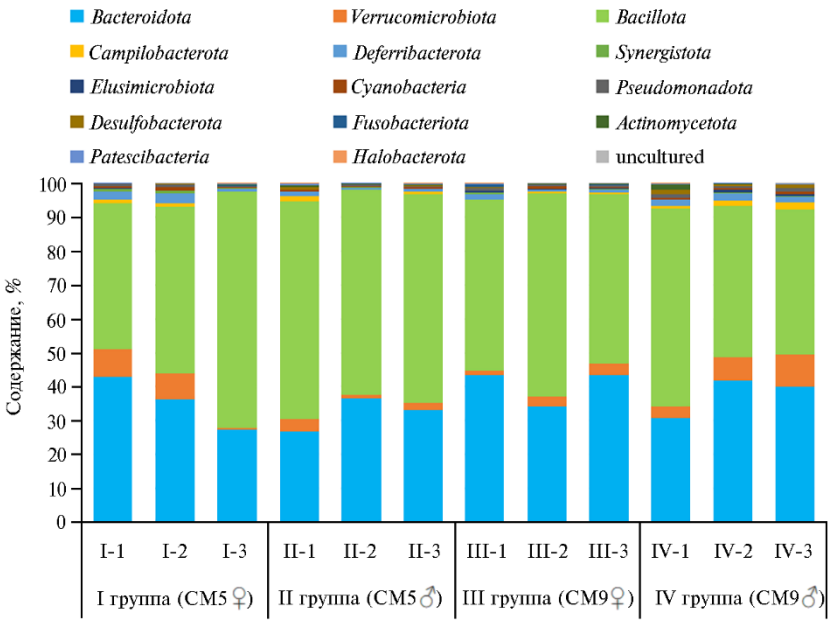

Рис. 5. Состав кишечного микробиома у кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий CM5 и CM9 кросса Смена 9 на уровне бактериальных филумов (по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S рРНК; опыт в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год).

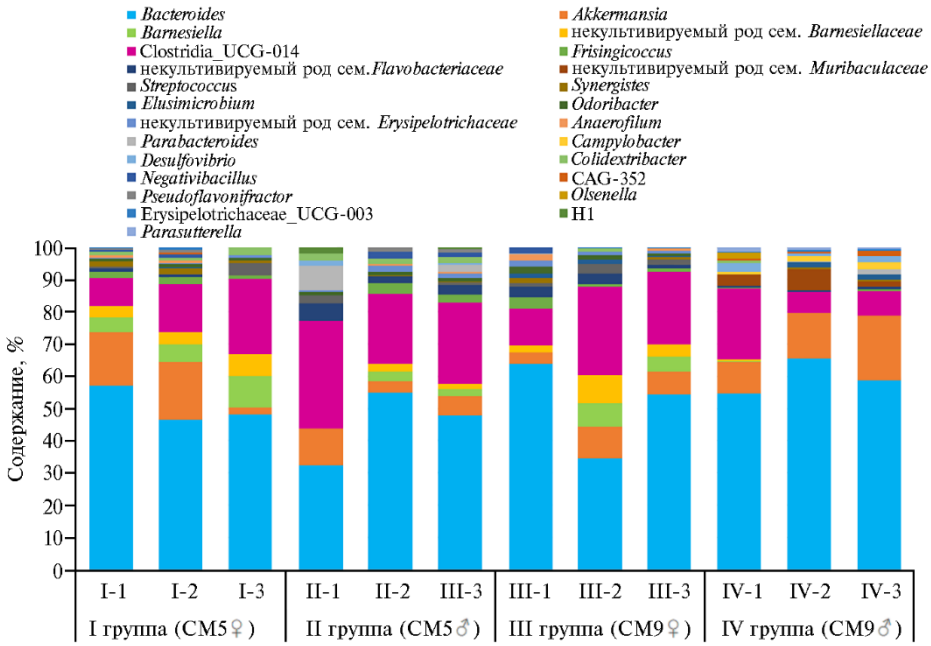

Рис. 6. Состав кишечного микробиома у кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий CM5 и CM9 кросса Смена 9 на уровне бактериальных родов (по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S рРНК; опыт в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год).

На уровне филумов главным отличием линии CM9 от линии CM5 по составу микробиома оказалось присутствие в слепых отростках кишечника кур и петухов (III и IV группы) бактерий суперфилума *Elusimicrobiota* (соответственно 0,32±0,11 и 0,49±0,19 %; $p \leq 0,05$). При этом в кишечнике петухов линии CM5 (II группа) эти микроорганизмы не были представлены, в кишечнике кур линии CM5 (I группа) их содержание составляло в среднем

0,04±0,01 %. Возможно, бактерии суперфилума *Elusimicrobiota* могут иметь связь с фенотипом улучшенной яйценоскости и репродуктивных способностей. Известно, что представители этого филума — постоянные обитатели кишечника у жука *Pachnoda ephippiata*, который питается в основном гумусом, а химус его кишечника содержит высокие концентрации глюкозы, пептидов и аминокислот (51). Представители суперфилума *Elusimicrobiota*, как предполагается, способствуют лучшему пищеварению *P. ephippiata* (52).

На уровне бактериальных родов различия между группами ($p \leq 0,05$) были обнаружены по 25 родам (рис. 6), у части которых представленность изменялась в зависимости от генотипа птицы, у части — от ее пола. Так, у петухов линии СМ5 (II группа) по сравнению с петухами линии СМ9 (IV группа) в слепых отростках кишечника обилие родов *Barnesiella* (суперфилум *Bacteroidota*), Clostridia_UCG-014 и *Frisingicoccus* (филум *Bacillota*) было выше ($p \leq 0,05$) соответственно в 17,2; 2,0 и 4,9 раза. Кроме того, у кур и петухов линии СМ5 (I и II группы) по сравнению с курами и петухами линии СМ9 (III и IV группы) обилие рода *Colidextribacter* (филум *Bacillota*) в кишечнике было выше ($p \leq 0,05$) соответственно в 4,7 и 7,5 раза. При этом представители рода *Pseudoflavonifractor* (филум *Bacillota*) в кишечнике кур и петухов линии СМ9 (группы III и IV) полностью отсутствовали, тогда как в химусе кур и петухов линии СМ5 (I и II группы) на долю этих микроорганизмов приходилось соответственно 0,22±0,09 и 0,26±0,05 %. Вероятно, представители упомянутых родов, большинство из которых относится к филуму *Bacillota*, могут иметь связь с фенотипом более высокой мясной продуктивности, наблюдаемой у линии СМ5 по сравнению с линией СМ9. Дело в том, что важная функция *Bacillota* — это способность разлагать сложные полисахариды с последующим образованием короткоцепочечных жирных кислот (53), которые играют важную роль в энергетическом метаболизме хозяина (и, как следствие, в формировании продуктивности), способствуют росту и нормальному функционированию клеток кишечника, с чем связано всасывание питательных веществ (54). Представители *Barnesiella* spp. суперфилума *Bacteroidota* участвуют в регуляции состава кишечной микробиоты, ограничивая размножение кислородоустойчивых патогенов, в частности несущих гены множественной устойчивости к антибиотикам, что может сказываться на здоровье и продуктивности хозяина (55). Ранее на примере двух линий цыплят было показано, что представитель филума *Bacillota* — род *Lactobacillus* играет ключевую роль в увеличении живой массы (12). По нашему мнению, генотип хозяина может повлиять на структуру микробного сообщества с помощью генотипически обусловленных факторов (к ним можно отнести состав секрета желез слизистой оболочки кишечника, особенности перистальтики, модификацию поверхности эпителиальных клеток), а также, как было показано в нашем исследовании, посредством изменения в экспрессии генов.

Интересно, что на уровне родов тоже отмечались различия между полами ($p \leq 0,05$) по составу микробиоты кишечника. Так, представители рода *Desulfovibrio* (суперфилум *Desulfovibrionia*) присутствовали в кишечнике петухов как линии СМ5, так линии СМ9 (II и IV группы) в количестве 0,25±0,08 и 0,73±5,6 %. При этом в кишечнике кур обеих линий (I и III группы) эти микроорганизмы не были обнаружены. Обилие представителей родов *Barnesiella* (суперфилум *Bacteroidia*) и *Synergistes* (суперфилум *Synergistia*), напротив, снижалось ($p \leq 0,05$) у петухов линий СМ5 и СМ9 (II и

IV группы) по сравнению с курами (I и III группы). Ранее на цыплятах также было показано (56), что состав микробиоты слепой кишки различался в зависимости от пола: у петушков отмечали обогащение микробиоты кишечника представителями *Bacteroidetes*, у курочек — рост численности клостридий и шигелл. При попытке выявить причины подобных изменений у мышей оказалось, что снижение уровня тестостерона при кастрации животных в пубертатный период устраняло половые различия в составе кишечной микробиоты у взрослых особей. Это указывает на важное значение пубертатного тестостерона для формирования сексуально диморфных микробных сообществ, которые сохраняются у самцов во взрослом возрасте (57). Однако механизм, с помощью которого тестостерон оказывает влияние на состав таких сообществ, в настоящее время не изучен.

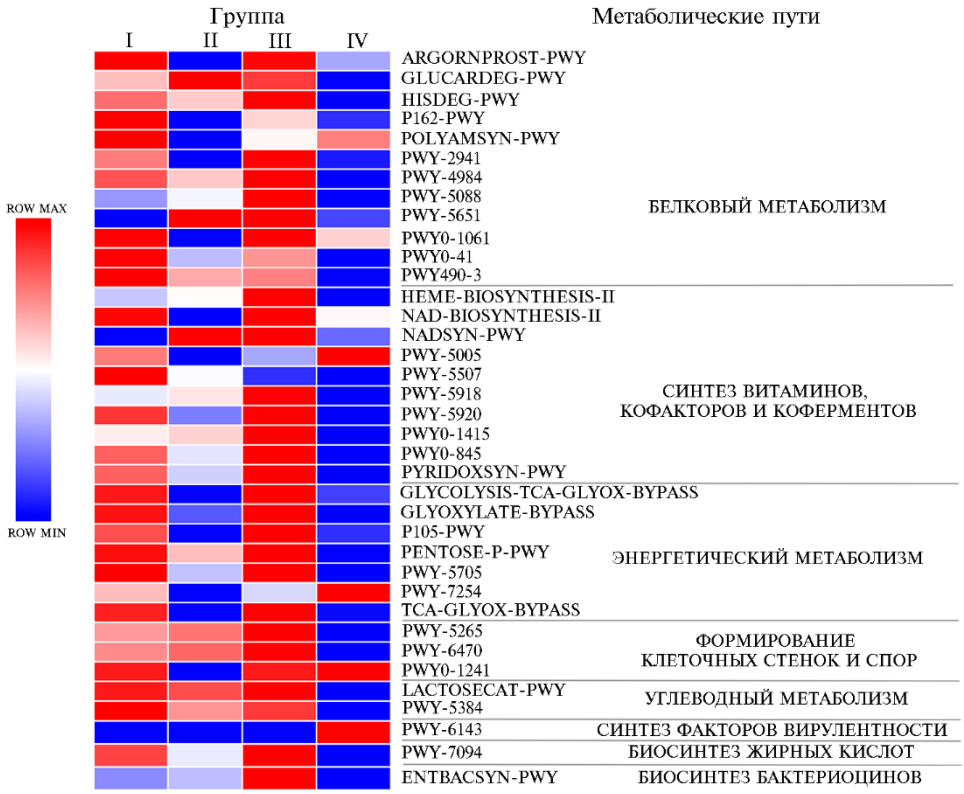

Рис. 7. Результаты функциональной аннотации прогнозируемых метаболических путей в микробиоме слепых отростков кишечника у кур и петухов (*Gallus gallus* L.) линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9 (по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S рРНК; опыт в виварии СГЦ «Загорское ЭПХ», Московская обл., 2022 год). Данные получены при помощи программного комплекса PICRUSt2 v.2.3.0 ((https://github.com/picrust/picrust2). Для анализа метаболических путей и ферментов пользовались базой данных MetaCyc (https://metacyc.org/). Шкала отражает интенсивность потенциальных метаболических путей микробиома: синий цвет — наименьшая (минимальная) интенсивность, красный — наибольшая (максимальная). Описание групп см. в разделе «Методика».

По результатам биоинформатической реконструкции и функциональной аннотации данных NGS-секвенирования в микробном сообществе кишечника у исследованной птицы мы обнаружили 357 прогнозируемых метаболических путей, по 65 из которых наблюдались различия ($p \leq 0{,}05$) между экспериментальными группами (рис. 7). Эти пути относились к белковому обмену (биосинтез и расщепление аминокислот, превращение азо-

тистых соединений), углеводному обмену (биосинтез и деградация сахаров), энергетическому обмену (цикл Кребса, гликолиз, глиоксилатный цикл), к синтезу жирных кислот, витаминов, кофакторов и коферментов (биотина, аденозилкобаламина, пиридоксальфосфата, гема), к образованию клеточной стенки и спорообразованию (синтез пептидогликана, АДФ-L-глицеро-бета-D-манно-гептозы), к синтезу факторов вирулентности (псевдаминовой кислоты), бактериоцинов. Большинство прогнозируемых метаболических путей, которые различались между экспериментальными группами ($p \leq 0{,}05$), были связаны с белковым и энергетическим метаболизмом, а также синтезом витаминов, кофакторов и коферментов. Наиболее значительные ($p \leq 0{,}05$) количественные различия между линиями СМ5 и СМ9 по предсказанным метаболическим путям касались формирования клеточных стенок и спор бактерий (до 4,9-кратных при сравнении II и IV групп), белкового метаболизма (до 3,4-кратных для II и IV групп), синтеза аденозилкобаламина (в 3,2 раза при сравнении I и III групп). Вероятно, повышенная активность указанных метаболических путей у линии СМ5 может быть связана с высокой мясной продуктивностью. Это представляется закономерным, поскольку основной компонент в кормах сельскохозяйственной птицы — протеин, продукты гидролиза которого всасываются из кишечника в кровь и используются организмом для пластических целей. В результате интенсификации белкового обмена дополнительно синтезируемые белки могут направляться на построение новых тканей в растущем организме. Стимулирующее влияние аденозилкобаламина на мясную продуктивность птицы также давно установлено (58).

Внутри линии СМ9 мы выявили существенные различия ($p \leq 0{,}05$) по ряду прогнозируемых метаболических путей между курами (III группа) и петухами (IV группа). Активность предполагаемых биологических функций микробного сообщества, влияющих на метаболизм белков, углеводов, на энергетический метаболизм, биосинтез жирных кислот, бактериоцинов, витаминов, кофакторов и коферментов, формирование клеточных стенок и спор бактерий, у кур (III группа) была выше, чем у петухов (IV группа) (различия до 5,9-кратных). При этом у петухов линии СМ9 по сравнению с курами (IV группа против III группы) в 5,8 раза усиливался ($p \leq 0{,}05$) путь синтеза CMP-псевдаминовой кислоты (PWY-6143) — фактора вирулентности патогенов (59). Ранее при проведении подобных исследований на мышах выяснилось, что активность прогнозируемых путей метаболизма жирных кислот и липидов более характерна для самцов, чем для самок (15). Наблюдаемое в нашем исследовании усиление метаболизма белков у кур линии СМ5 по сравнению с линией СМ9 может быть связано с возрастанием обилия представителей рода *Synergistes* в кишечнике (их основная функция — утилизация аминокислот) (60). На усиление пути синтеза CMP-псевдаминовой кислоты у петухов линии СМ9 по сравнению с курами может влиять снижение численности бактерий рода *Barnesiella*, которые, как уже отмечалось, ограничивают размножение кислородоустойчивых патогенов (55). Повышение патогенности кишечной микробиоты у петухов линии СМ9 могло индуцировать экспрессию генов антимикробных пептидов и *IL8* в бурсе.

Таким образом, на примере отцовской линии корниш СМ5 и материнской линии плимутрок СМ9 нового кросса Смена 9, имеющих различные фенотипы (паттерны) по мясной продуктивности и эффективности воспроизводства (3-5), мы продемонстрировали достаточно высокую зави-

симость транскрипционной активности генов, связанных у кур с адаптационным потенциалом и иммунитетом (35, 39), от генотипа и пола. Полученные данные могут представлять ценность для выявления новых генов-кандидатов, влияющих на мясную продуктивность и яйценоскость. Мы также получили результаты, демонстрирующие взаимосвязь количественного состава микробиоты и ее прогнозируемых метаболических путей с генотипом и полом птицы. Специфические для генотипа и пола изменения в экспрессии генов, а также в структуре и функциях кишечного микробиома могут составлять основу физиологических адаптаций макроорганизма к различным условиям. Мы полагаем, что механизм, определяющий различия в составе кишечной микробиоты в зависимости от пола и генотипа у птицы линий СМ5 и СМ9 кросса Смена 9, может заключаться в тонкой гармонизации транскрипционной активностью генов адаптации и иммунитета — с одной стороны и, по всей видимости, гормонального фона, пищевых потребностей и обеспеченности питательными веществами и энергией — с другой. Понимание таких взаимозависимостей важно для сохранения здоровья, улучшения воспроизводительной способности и повышения продуктивности птицы, а для установления причинно-следственных связей между ними требуются дальнейшие исследования. В частности, представляет интерес сравнительная оценка экспрессии генов яичной и мясной продуктивности у линий СМ5 и СМ9 в сочетании с анализом состава и функциональной аннотацией кишечной микробиоты.

Итак, мы оценили различия в экспрессии спектра генов иммунитета и генов, связанных с адаптационным потенциалом, соответственно в бурсе и печени, а также определили состав и функции микробиома слепых отростков кишечника у кур и петухов линий СМ5 и СМ9 нового кросса Смена 9 (родительское поголовье). Линии различаются по приросту живой массы и яичной продуктивности. Результаты показали повышение транскрипционной активности генов *HSF1* и *HSF2* у петухов линии СМ5 (II группа) по сравнению с I, III и IV группами (соответственно куры отцовской линии СМ5 породы корниш, куры материнской линии СМ9 породы плимутрок, петухи материнской линии СМ9 породы плимутрок). Разница в экспрессии генов *HSF1* и *HSF2* в сравнении с петухами линии СМ9 (IV группа) составляла соответственно 68 и 218 %. Экспрессия генов *HSF1* и *HSF2* внутри линии СМ5 у петухов (II группа) была выше соответственно в 1,6 и 3,0 раза по сравнению с курами (I группа). Наблюдалась существенная активация экспрессии генов антимикробных пептидов и провоспалительных генов у петухов линии СМ9 (IV группа) по сравнению с петухами и курами линии СМ5 (I и II группы). Так, по сравнению со II группой экспрессия генов *AvBD2*, *AvBD9*, *AvBD10*, *IL8* и *PTGS2* увеличивалась соответственно в 7,6; 5,3; 2,1; 6,3 и 1,5 раза. При проведении NGS-секвенирования микробиома слепых отростков кишечника у кур и петухов линии СМ9 (III и IV группы) выявили бактерии суперфилума *Elusimicrobiota* (соответственно 0,32±0,11 и 0,49±0,19 %). При этом в кишечнике петухов линии СМ5 (II группа) эти микроорганизмы не были представлены, а у кур линии СМ5 (I группа) их доля составляла в среднем 0,04±0,01 %. Между группами выявлены различия по 25 родам бактерий. У части родов обилие изменялось в зависимости от генотипа, у части — от пола птицы. Так, у петухов линии СМ5 (II группа) обилие родов *Barnesiella*, Clostridia_UCG-014 и *Frisingicoccus* в слепых отростках кишечника было выше (соответственно в 17,2; 2,0 и 4,9 раза), чем у петухов линии СМ9 (IV группа). Представители рода *Desulfovibrio* присутство-

вали в кишечнике петухов как линии CM5, так и линии CM9 (II и IV группы, 0,25±0,08 и 0,73±5,6 %), но в кишечнике кур обеих линий (I и III группы) эти микроорганизмы не обнаружены. По результатам биоинформатической реконструкции и функциональной аннотации данных NGS-секвенирования, в микробном сообществе кишечника исследованной птицы мы выявили 357 прогнозируемых метаболических путей, по 65 из которых наблюдались различия между группами. Специфические для генотипа и пола модуляции в экспрессии генов, а также в структуре и функциях кишечного микробиома могут обеспечивать адаптацию макроорганизма в изменяющихся условиях.

[1]ООО «БИОТРОФ+»,
192284 Россия, г. Санкт-Петербург, Загребский б-р, 19, корп. 1,
e-mail: laptev@biotrof.ru, kseniya.k.a.@biotrof.ru, dubrovin@biotrof.ru, tiurina@biotrof.ru;
[2]ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,
196601 Россия, г. Санкт-Петербург, Петербургское ш., 2, лит. А,
e-mail: deniz@biotrof.ru ✉, ilina@biotrof.ru;
[3]ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН,
141311 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад,
ул. Птицеградская, 10,
e-mail: fisinin@vnitip.ru, olga@vnitip.ru, eta164@yandex.ru, vard13@yandex.ru, dissovet@vnitip.ru

Поступила в редакцию 21 ноября 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2023, V. 58, № 2, pp. 313-332

EXPRESSION OF GENES OF IMMUNE RESPONSE AND ADAPTATION AND CECAL MICROBIOME COMPOSITION IN MALES AND FEMALES OF CHICKENS (*Gallus gallus* L.) IN CM5 AND CM9 PREPARENTAL LINES OF SMENA 9 CROSS

G.Yu. Laptev[1], E.A. Yildirim[1, 2] ✉, L.A. Ilyina[1, 2], V.A. Filippova[1, 2], K.A. Kalitkina[1], E.S. Ponomareva[1], A.V. Dubrovin[1], D.G. Tyurina[1], V.I. Fisinin[3], I.A. Egorov[3], T.A. Egorova[3], V.A. Manukyan[3], T.N. Lenkova[3]

[1]*JSC Biotrof+,* 19, korp. 1, Zagrebskii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail laptev@biotrof.ru, kseniya.k.a.@biotrof.ru, dubrovin@biotrof.ru, tiurina@biotrof.ru;
[2]*Saint Petersburg State Agrarian University,* 2, lit. A, Peterburgskoye sh., St. Petersburg, 196601 Russia, e-mail deniz@biotrof.ru (✉ corresponding author), ilina@biotrof.ru;
[3]*Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Institute of Poultry RAS,* 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia, e-mail fisinin@vnitip.ru, olga@vnitip.ru, eta164@yandex.ru, vard13@yandex.ru, dissovet@vnitip.ru

Laptev G.Yu. orcid.org/0000-0002-8795-6659
Yildirim E.A. orcid.org/0000-0002-5846-4844
Ilyina L.A. orcid.org/0000-0003-2490-6942
Filippova V.A. orcid.org/0000-0001-8789-9837
Kalitkina K.A. orcid.org/0000-0002-9541-6839
Ponomareva E.S. orcid.org/0000-0002-4336-8273
Dubrovin A.V. orcid.org/0000-0001-8424-4114
Tyurina D.G. orcid.org/0000-0001-9001-2432
Fisinin V.I. orcid.org/0000-0003-0081-6336
Egorov I.A. orcid.org/0000-0001-9122-9553
Egorova T.A. orcid.org/0000-0002-5102-2248
Manukyan V.A. orcid.org/0000-0003-4564-4427
Lenkova T.N. orcid.org/0000-0001-8026-3983

The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No 22-66-00061 "Expression of productivity and resistibility related genes in chickens of new Russian broiler cross Smena-9 and its effects on immunity and realization of genetic productivity potential with different energy and amino acid nutrition"
Final revision received November 21, 2022
Accepted July 18, 2022
doi: 10.15389/agrobiology.2023.2.313eng

Abstract

The Cornish and Plymouthrock breeds form the basis of modern specialized meat crosses of chickens. The selection of the paternal line of the Cornish CM5 breed of the new Russian cross of meat chickens Smena 9 is carried out mainly on the basis of meat productivity, while the maternal line of the Plymouthrock CM9 breed is primarily for reproductive efficiency and viability at a lower

live growth rate than that of the CM5 line masses. In the present study, we revealed for the first time that hens and roosters of the parent stock of lines CM5 and CM9 of the novel cross Smena 9 differ in the expression of some immunity and adaptation genes, as well as in the composition of the microbiome and its putative metabolic pathways. Differences are related to genotype and sex. The aim of the work was to compare the level of expression of immunity genes and genes associated with adaptive potential, respectively, in the tissues of the bursa in the liver, as well as the composition and functions of the microbiome of the caecum of the intestine in chickens and roosters of the CM5 and CM9 lines. The experiments were carried out in the vivarium of the Zagorsk EPH (Moscow Province, 2022) on the parent stock of chickens and roosters of the CM5 and CM9 lines of 39 weeks of age, kept under identical conditions and receiving the same diet. From each line and gender, tissue samples were taken from five individuals with a close live weight. Analysis of gene expression in tissue samples was performed using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Total RNA was isolated using the Aurum™ Total RNA mini kit (Bio-Rad, USA). PCR amplification was performed using SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) and a detecting amplifier DTlight (DNA-Technology, Russia). In the liver tissues, we analyzed the expression of genes associated with the adaptive potential: genes *CAT1* of the transporter of cationic amino acids 1, *HSF1* and *HSF2* — transcription factors of heat shock proteins 1 and 2, *SOD* — superoxide dismutase, *Gpx1* — glutathione peroxidase, *HO-1* — heme oxygenase-1. In the tissues of the bursa, the expression of genes associated with immunity was analyzed: genes *IL8* — interleukin-8, *IRF7* — regulatory factor interferon 7, *PTGS2* — prostaglandin endoperoxide synthase, *AvBD1*, *AvBD2, AvBD9* and *AvBD10* — β-defensins 1, 2, 9 and 10, *Casp6* — caspase 6. A primer for the β-actin gene (ACTB) was used as a reference control. The relative level of expression was assessed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Total DNA for analysis of the composition of the microbiome was isolated using the Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). The caecal bacterial community was assessed by NGS sequencing on the MiSeq platform (Illumina, Inc., USA) with primers for the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. The reconstruction and prediction of the functional content of the metagenome, gene families, and enzymes was carried out using the PICRUSt2 software package (v. 2.3.0). Mathematical and statistical processing of the results was carried out by the method of multivariate analysis of variance (ANOVA) in Microsoft Excel XP/2003 and R-Studio (v. 1.1.453). The results obtained showed an increase in the expression of the *HSF1* and *HSF2* genes in CM5 cocks compared to other groups ($p \leq 0.05$), in particular, the difference with CM9 cocks was 68 and 218 %, respectively ($p \leq 0.05$). The expression of the *HSF1* and *HSF2* genes within the CM5 line in roosters was 1.6 and 3.0 times higher, respectively, than in hens ($p \leq 0.05$). Significant activation of the expression of antimicrobial peptides and pro-inflammatory genes occurred in CM9 cocks compared to CM5 cocks and hens ($p \leq 0.05$). The expression of *AvBD2, AvBD9, AvBD10, IL8* and *PTGS2* genes in CM9 cocks increased 7.6-, 5.3-, 2.1-, 6.3- and 1.5-fold ($p \leq 0.05$), respectively, compared to CM5 cocks. NGS sequencing showed that the microbiome of the caecum of the CM9 hens and roosters contained bacteria of the superphylum *Elusimicrobiota* (0.32±0.11 and 0.49±0.19 %, respectively). These microorganisms did not occur in CM5 roosters while in the SM5 hens, their proportion was 0.04±0.01 %. Significant ($p \leq 0.05$) differences were found between the groups in 25 genera, in some genera, it depends on the genotype, in others — on the sex of the bird. For example, in cocks of the CM5 line, the abundance of microorganisms of the genera *Barnesiella*, Clostridia_UCG-014 and *Frisingicoccus* was 17.2, 2.0 and 4.9 times higher ($p \leq 0.05$), respectively, than in males of the CM9 line. Members of the genus *Desulfovibrio* were present in the intestines of CM5 and CM9 cocks (0.25±0.08 and 0.73±5.6 %). However, we did not find these microorganisms in the intestines of hens of both lines. Based on the results of bioinformatics reconstruction and functional annotation of NGS sequencing data, we identified 357 putative metabolic pathways in the gut microbial community, 65 of which differed ($p \leq 0.05$) between test groups. Genotype- and sex-specific modifications in gene expression, as well as in the structure and function of the gut microbiome, may provide adaptation of a macroorganism under changing conditions.

Keywords: broiler cross, Smena 9, caecum, microbiome, NGS sequencing, predicted metabolic pathways, gene expression, immunity, adaptations, bursa, liver.

REFERENCES

1. Emanuylova Zh.V., Egorova A.V., Efimov D.N., Komarov A.A. *Agrarnaya nauka*, 2021, 7-8: 33-36 (doi: 10.32634/0869-8155-2021-351-7-8-33-36) (in Russ.).
2. Dorshorst B.J., Ashwell C.M. Genetic mapping of the sex-linked barring gene in the chicken. *Poultry Science*, 2009, 88(9): 1811-1817 (doi: 10.3382/ps.2009-00134).
3. Konopleva A.P., Efimov D.N., Baykovskaya E.Yu., Emanuylova Zh.V. *Ptitsevodstvo*, 2021, 11: 16-20 (doi: 10.33845/0033-3239-2021-70-11-16-20) (in Russ.).

4. Egorova A.V., Efimov D.N., Emanuylova Zh.V., Komarov A.A. *Ptitsevodstvo*, 2021, 3: 4-8 (doi: 10.33845/0033-3239-2021-70-3-4-8) (in Russ.).
5. Lopez G., de Lange K., Leeson S. Partitioning of retained energy in broilers and birds with intermediate growth rate. *Poultry Science*, 2007, 86(10): 2162-2171 (doi: 10.1093/ps/86.10.2162).
6. Davis R.V., Lamont S.J., Rothschild M.F., Persia M.E., Ashwell C.M., Schmidt C.J. Transcriptome analysis of post-hatch breast muscle in legacy and modern broiler chickens reveals enrichment of several regulators of myogenic growth. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0122525 (doi: 10.1371/journal.pone.0122525).
7. Huang L., Hu Y., Guo Q., Chang G., Bai H. Time-course transcriptome landscape of bursa of Fabricius development and degeneration in chickens. *Agriculture*, 2022, 12(8): 1194 (doi: 10.3390/agriculture12081194).
8. Dйsert C., Duclos M.J., Blavy P., Lecerf F., Moreews F., Klopp C., Aubry M., Herault F., Le Roy P., Berri C., Douaire M., Diot C., Lagarrigue S. Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics*, 2008, 9: 611 (doi: 10.1186/1471-2164-9-611).
9. Li J., Liu X., Xing L., Liu H., Li X., Bao J. Gene expression profiling of broiler liver under cold stress by high-throughput sequencing technology. *Journal of Poultry Science*, 2017, 54(3): 185-196 (doi: 10.2141/jpsa.0160142).
10. Sheng Z., Pettersson M.E., Hu X., Luo C., Qu H., Shu D., Shen X., Carlborg O., Li N. Genetic dissection of growth traits in a Chinese indigenous x commercial broiler chicken cross. *BMC Genomics*, 2013, 14: 151 (doi: 10.1186/1471-2164-14-151).
11. Zheng X., Zhang B., Zhang Y., Zhong H., Nie R., Li J., Zhang H., Wu C. Transcriptome analysis of feather follicles reveals candidate genes and pathways associated with pheomelanin pigmentation in chickens. *Scientific Reports*, 2020, 10: 12088 (doi: 10.1038/s41598-020-68931-1).
12. Zhao L., Wang G., Siegel P., He C., Wang H., Zhao W., Zhai Z., Tian F., Zhao J., Zhang H., Sun Z., Chen W., Zhang Y., Meng H. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1163 (doi: 10.1038/srep01163).
13. Song J.S., Woodhams D.C., Martino C., Allaband C., Mu A., Javorschi-Miller-Montgomery S., Suchodolski J.S., Knight R. Engineering the microbiome for animal health and conservation. *Experimental Biology and Medicine*, 2019, 244(6): 494-504 (doi: 10.1177/1535370219830075).
14. Kogut M.H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 250(1): 32-40 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008).
15. Wankhade U.D., Zhong Y., Lazarenko O.P., Chintapalli S.V., Piccolo B.D., Chen J.-R., Shankar K. Sex-specific changes in gut microbiome composition following blueberry consumption in C57BL/6J mice. *Nutrients*, 2019, 11(2): 313 (doi: 10.3390/nu11020313).
16. Yyldyrym E.A., Grozina A.A., Vertiprakhov V.G., Il'ina L.A., Filippova V.A., Laptev G.Yu., Brazhnik E.A., Kalitkina K.A., Tarlavin N.V., Dubrovin A.V., Novikova N.I., Tyurina D.G. Effect of T-2 toxin on expression of genes associated with immunity in tissues of the blind processes of the intestinal and pancreas of broilers (*Gallus gallus* L.). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2021, 56(4): 664-681 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.664eng).
17. Egorov I.A., Lenkova T.N., Manukyan V.A., Egorova T.A., Nikonov I.N., Il'ina L.A., Laptev G.Yu. Poultry diets without antobiotics. I. Intestinal microbiota and performance of broiler (*Gallus gallus* L.) breeders fed diets with enterosorbent possessing phytobiotic and probiotic effects. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2019, 54(2): 280-290. (doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.280eng).
18. Yyldyrym E.A., Grozina A.A., Vertiprakhov V.G., Il'ina L.A., Filippova V.A., Laptev G.Yu., Ponomareva E.S., Dubrovin A.V., Kalitkina K.A., Molotkov V.V., Akhmatchin D.A., Brazhnik E.A., Novikova N.I., Tyurina D.G. Composition and metabolic potential of the intestinal microbiome of *Gallus gallu*s L. broilers under experimental T-2 toxicosis as influenced by feed additives. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2022, 57(4): 743-761 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.4.743eng).
19. Jašarevi E., Morrison K.E., Bale T.L. Sex differences in the gut microbiome-brain axis across the lifespan. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 2016, 371(1688): 20150122 (doi: 10.1098/rstb.2015.0122).
20. Yang X., Schadt E.E., Wang S., Wang H., Arnold A.P., Ingram-Drake L., Drake T.A., Lusis A.J. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Research*, 2006, 16(8): 995-1004 (doi: 10.1101/gr.5217506).
21. Niemann H., Kuhla B., Flachowsky G. Perspectives for feed-efficient animal production. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(12): 4344-4363 (doi: 10.2527/jas.2011-4235).
22. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS № 123) (Strasburg, 18.03.1986)*. Available: https://norecopa.no/legislation/council-of-europe-convention-ets-123/. No date.
23. Efimov D.N., Egorova A.V., Emanuylova Zh.V., Ivanov A.V., Konopleva A.P., Zotov A.A., Lukashenko V.S., Komarov A.A., Egorova I.A., Egorova T.A., Baykovskaya E.Yu., Manukyan V.A., Saleeva I.P., Kavtarashvili A.Sh., Smolov S.V. *Rukovodstvo po rabote s ptitsey myasnogo krossa Smena 9 s autoseksnoy materinskoy roditel'skoy formoy* /Pod redaktsiey D.N. Efimova, V.I.

Fisinina [Manual for working with meat cross-country poultry Smena 9 with autosex maternal parental form. D.N. Efimov, V.I. Fisinin (eds.)]. Sergiev Posad, 2021 (in Russ.).
24. Zeka F., Vanderheyden K., Smet E., Cuvelier C., Mestdagh P., Vandesompele J. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21418 (doi: 10.1038/srep21418).
25. Grigor'eva M.A., Velichko O.A., Shabaldin S.V., Fisinin V.I., Suray P.F. Vitagene regulation as a new strategy to fight stresses in poultry production. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2017, 52(4): 716-730 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.4.716eng).
26. Meza Cerda M.-I., Gray R., Higgins D.P. Cytokine RT-qPCR and ddPCR for immunological investigations of the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) and other mammals. *PeerJ*, 2020, 8: e10306 (doi: 10.7717/peerj.10306).
27. Laptev G.Y., Filippova V.A., Kochish I.I., Yildirim E.A., Ilina L.A., Dubrovin A. V, Brazhnik E.A., Novikova N.I., Novikova O.B., Dmitrieva M.E., Smolensky V.I., Surai P.F., Griffin D.K., Romanov M.N. Examination of the expression of immunity genes and bacterial profiles in the caecum of growing chickens infected with *Salmonella enteritidis* and fed a phytobiotic. *Animals*, 2019, 9(9): 615 (doi: 10.3390/ani9090615).
28. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408 (doi: 10.1006/meth.2001.1262).
29. Rabindran S.K., Giorgi G., Clos J., Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 1991, 88(16): 6906-6910 (doi: 10.1073/pnas.88.16.6906).
30. Cedraz H., Gromboni J.G.G., Garcia A.A.P. Junior, Farias Filho R.V., Souza T.M., Oliveira E.R., Oliveira E.B., Nascimento C.S.D., Meneghetti C., Wenceslau A.A. Heat stress induces expression of *HSP* genes in genetically divergent chickens. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186083 (doi: 10.1371/journal.pone.0186083).
31. McManus C.J., Coolon J.D., Duff M.O., Eipper-Mains J., Graveley B.R., Wittkopp P.J. Regulatory divergence in Drosophila revealed by mRNA-seq. *Genome Research*, 2010, 20(6): 816-825 (doi: 10.1101/gr.102491.109).
32. Zuidhof M.J., Schneider B.L., Carney V.L., Karver D.R., Robinson F.E. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science*, 2014, 93(12): 2970-2982 (doi: 10.3382/ps.2014-04291).
33. Oliver F., Christians J.K., Liu X., Rhind S., Verma V., Davison C., Brown S.D.M., Denny P., Keightley P.D. Regulatory variation at glypican-3 underlies a major growth QTL in mice. *PLoS Biology*, 2005, 3(5): e135 (doi: 10.1371/journal.pbio.0030135).
34. Rodriguez K.A., Valentine J.M., Kramer D.A., Gelfond J.A., Kristan D.M., Nevo E., Buffenstein R. Determinants of rodent longevity in the chaperone-protein degradation network. *Cell Stress & Chaperones*, 2016, 21(3): 453-466 (doi: 10.1007/s12192-016-0672-x).
35. Li Y., Ma Q.G., Zhao L.H., Wei H., Duan G.X., Zhang J.Y., Ji C. Effects of lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin contaminated diets. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(4): 5649-5662 (doi: 10.3390/ijms15045649).
36. Otterbein L.E., Foresti R., Motterlini R. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart: the balancing act between danger signaling and pro-survival. *Circulation Research*, 2016, 118(12): 1940-1959 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306588).
37. Surai P.F., Fisinin V.I., Karadas F. Antioxidant systems in chick embryo development. Pt. 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition*, 2016, 2(1): 1-11 (doi: 10.1016/j.aninu.2016.01.001).
38. Johnsson M., Henriksen R., Нuglund A., Fogelholm J., Jensen P., Wright D. Genetical genomics of growth in a chicken model. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 72 (doi: 10.1186/s12864-018-4441-3).
39. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(9): 710-720 (doi: 10.1038/nri1180).
40. Lynn D.J., Higgs R., Lloyd A.T., O'Farrelly C., Hervé-Grépinet V., Nys Y., Brinkman F.S., Yu P.L., Soulier A., Kaiser P., Zhang G., Lehrer R.I. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunology Letters*, 2007, 110(1): 86-89 (doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.007).
41. Lee M.O., Jang H.J., Rengaraj D., Yang S.Y., Han J.Y., Lamont S.J., Womack J.E. Tissue expression and antibacterial activity of host defense peptides in chicken. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12(1): 231 (doi: 10.1186/s12917-016-0866-6).
42. Antonopoulos A.S., Papanikolaou E., Vogiatzi G., Oikonomou E., Tousoulis D. Anti-inflammatory agents in peripheral arterial disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 2017, 39(1): 1-8 (doi: 10.1016/j.coph.2017.11.001).
43. Rychlik I., Elsheimer-Matulova M., Kyrova K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with nontyphoid Salmonella. *Veterinary Research*, 2014, 45(1): 119 (doi: 10.1186/s13567-014-0119-2).
44. Prescott S.M., Fitzpatrick F.A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1470(2): M69-M78 (doi: 10.1016/s0304-419x(00)00006-8).
45. Thuresson E.D., Lakkides K.M., Rieke C.J., Sun Y., Wingerd B.A., Micielli R., Mulichak A.M., Malkowski M.G., Garavito R.M., Smith W.L. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the

functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(13): 10347-10357 (doi: 10.1074/jbc.M009377200).
46. Stearns S.C. *The evolution of life histories*. NY, Oxford University Press, 1992.
47. Chao C.H., Lee Y.P. Relationship between reproductive performance and immunity in Taiwan country chickens. *Poultry Science*, 2001, 80(5): 535-540 (doi: 10.1093/ps/80.5.535).
48. Langille M.G., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J.A., Clemente J.C., Burkepile D.E., Vega Thurber R.L., Knight R., Beiko R.G., Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821 (doi: 10.1038/nbt.2676).
49. Dibner J.J., Richards J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture history and mode of action. *Poultry Science*, 2005, 84(4): 634-643 (doi: 10.1093/ps/84.4.634).
50. Xiao Y., Xiang Y., Zhou W., Chen J., Li K., Yang H. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poultry Science*, 2017, 96(5): 1387-1393 (doi: 10.3382/ps/pew372).
51. Andert J., Geissinger O., Brune A. Peptidic soil components are a major dietary resource for the humivorous larvae of *Pachnoda* spp. (*Coleoptera: Scarabaeidae*). *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54(1): 105-113 (doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.08.006).
52. Lemke T., Stingl U., Egert M., Friedrich M.W., Brune A. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6650-6658 (doi: 10.1128/AEM.69.11.6650-6658.2003).
53. Macfarlane S., Macfarlane G.T. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, 62(1): 67-72 (doi: 10.1079/PNS2002207).
54. Silva Y.P., Bernardi A., Frozza R.L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 25 (doi: 10.3389/fendo.2020.00025).
55. Ubeda C., Bucci V., Caballero S., Djukovic A., Toussaint N.C., Equinda M., Lipuma L., Ling L., Gobourne A., No D., Taur Y., Jenq R.R., van den Brink M.R., Xavier J.B., Pamer E.G. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infection and Immunity*, 2013, 81(3): 965-973 (doi: 10.1128/IAI.01197-12).
56. Lee K.C., Kil D.Y., Sul W.J. Cecal microbiome divergence of broiler chickens by sex and body weight. *Journal of Microbiology*, 2017, 55(12): 939-945 (doi: 10.1007/s12275-017-7202-0).
57. Yurkovetskiy L., Burrows M., Khan A.A., Graham L., Volchkov P., Becker L., Antonopoulos D., Umesaki Y., Chervonsky A.V. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity*, 2013, 39(2): 400-412 (doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.013).
58. Halle I., Henning M., Koehler P. Influence of vitamin B 12 and cobalt on growth of broiler chickens and Pekin ducks. *Landbauforschung Volkenrode*, 2011, 61(4): 299-306.
59. Schoenhofen I.C., McNally D.J., Brisson J.-R., Logan S.M. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology*, 2006, 16(9): 8C-14C (doi: 10.1093/glycob/cwl010).
60. Godon J.J., Moriniere J., Moletta M., Gaillac M., Bru V., Delgenes J.P. Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the 'Synergistes' example. *Environmental Microbiology*, 2005. 7(2):213-224 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00693.x).